

Министерство науки и высшего образования РФ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Специальность: 06.03.01 (ОКСО 020400.62) - Биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Дипломная работа

ЭРАДИКАЦИЯ ПОЛИМИКРОБНЫХ БИОПЛЕНОК СОЧЕТАННЫМ
ДЕЙСТВИЕМ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ И
ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА

Работа завершена:

" 31 " 05 2021 г.



(А.Б. Рыскулова)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель

к.б.н., доцент кафедры генетики

" 01 " 06 2021 г.



(А.Р. Каюмов)

м.н.с.

" 01 " 06 2021 г.



(А.Э. Гатина)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

" 02 " 06 2021 г.



(В.М. Чернов)

Казань - 2021

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1 Взаимодействие между сообществами грибов и бактерий.....	8
1.2 Полимикробные взаимодействия.....	12
1.3 Образование полимикробных биопленок	14
1.4 Инфекции, связанные с биопленками	17
1.5 Методы борьбы с биопленками	18
Заключение	24
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	25
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	25
2.1 Исследуемые соединения	25
2.2 Штаммы	25
2.3 Питательные среды и условия культивирования бактерий	25
2.4 Выделение плазмидной ДНК с помощью GeneJET Plasmid Miniprep Kit	26
2.5 Электрофорез ДНК.....	27
2.6 Трансформация клеток <i>E. coli</i> методом теплового шока	27
2.7 Гиперпродукция белков в клетках <i>E. coli</i> и получение клеточных экстрактов.....	28
2.8 Очистка белка на Strep-tactin сефарозе	28
2.9 Определение количества белка по методу Мэрион Брэдфорд (Bradford, 1976).....	29

2.10 Электрофорез белков в денатурирующих условиях.....	29
2.11 Окрашивание белковых гелей Coomassie brilliant blue R250.....	30
2.12 Определение количества жизнеспособных клеток в составе биопленки	30
2.13 Статистическая обработка результатов.....	30
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	31
3.1 Экспрессия сахаразы SacC в клетках <i>E. coli</i> BL21.....	31
3.2 Очистка сахаразы SacC методом аффинной хроматографии	31
3.3 Оценка активности сочетанного действия антимикробных препаратов и ферментативного гидролиза в составе полимикробной биопленки	32
ВЫВОДЫ	36
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	37

ВВЕДЕНИЕ

Образование биопленок является предпочтительным образом жизни для многих микроорганизмов, включая бактериальные и грибковые патогены человека. Биопленка - это прочный и динамичный консорциум, который предоставляет своим членам широкий спектр преимуществ, таких как способность к адгезии/когезии, механическая стойкость к удалению и высыханию, платформа обмена метаболитами и источниками питания, клеточная связь, защита и устойчивость к лекарствам (например, противомикробным препаратам, антисептикам, и дезинфицирующим средствам), стрессовым факторам окружающей среды (обезвоживание и ультрафиолет), иммунным атакам хозяина (антитела, система комплемента, антимикробные пептиды и фагоциты) [Santos *et al.*, 2018].

Бактериальные биопленки - одна из основных проблем при лечении хронических инфекций, таких как хронические раны, где биопленки обычно полимикробны. Синергия между видами может происходить во время большинства полимикробных инфекций, в результате чего повышается устойчивость к противомикробным препаратам [Fanaei Pirlar *et al.*, 2020]. Лечение полимикробных инфекций создает дополнительные терапевтические проблемы по сравнению с их мономикробными аналогами, поскольку эффективность антибиотиков или других противомикробных агентов может сильно различаться, когда они направлены против отдельных видов микробов или сообществ, состоящих из различных комбинаций микробов [Orazi *et al.*, 2017]. Таким образом, существует большая потребность в альтернативных стратегиях борьбы с инфекциями, связанными с биопленками, помимо терапии антибиотиками. Учитывая количество пациентов, страдающих от инфекций, связанных с устройствами на основе биопленок, за последние несколько десятилетий было разработано несколько стратегий по борьбе с ними [Subhadra *et al.*, 2018].

Поскольку самостоятельное продуцируемое внеклеточное полимерное вещество (EPS) в биопленках приводит к высокой толерантности к антибиотикам, нарушение EPS является одним из эффективных подходов к уничтожению биопленок. Следовательно, разложение EPS с использованием ферментов может привести к лучшему заживлению хронических ран [Fanaei Pirlar *et al.*, 2020].

В биопленке бактерии погружены в продуцируемый ими внеклеточный матрикс, который состоит из полисахаридов, белков и нуклеиновых кислот, при этом соотношение этих макромолекул сильно различается для различных видов микроорганизмов [Branda *et al.*, 2005]. Устойчивость бактерий в составе биопленок обусловлена множеством факторов, основным из которых является наличие экзополисахаридного матрикса, который представляет собой многокомпонентную систему способную подавлять действия антибиотиков [McCarthy *et al.*, 2015]. Так, во время образования биопленки *P. aeruginosa* продуцирует три основных экзополисахарида, а именно альгинат, Pel и Psl, которые образуют внеклеточный матрикс в биопленке, проявляя как структурные, так и защитные функции [Ryder *et al.*, 2007].

В настоящее время предложен ряд ферментов, обладающих способностью гидролизовать компоненты матрикса биопленки *P. aeruginosa* (например, альгинат лиаза, α -амилаза, α -маннозидаза, целлюлаза, PelAh, PslGH) [Lamppa, Griswold, 2013; Alkawash *et al.*, 2006; Fleming *et al.*, 2017; Banar *et al.*, 2016; Baker *et al.*, 2016]. В связи с этим представляет интерес провести скрининг гомологичных ферментов из других бактерий с целью поиска агентов для разрушения биопленки этих микроорганизмов. В нашей лаборатории было показано, что сахараза SacC гидролизует матрикс биопленки *P. aeruginosa* и способствует повышению эффективности антибиотиков.

Целью работы было установить влияние сочетанного действия антимикробных препаратов и ферментативного гидролиза на эрадикацию полимикробных биопленок.

В соответствии с поставленной целью в работе решались следующие **задачи**:

- 1) Экспрессировать сахаразы SacC в клетках *E. coli*.
- 2) Провести очистку сахаразы SacC методом аффинной хроматографии на Strep-tactin сефарозе.
- 3) Оценить влияние сочетанного действия сахаразы SacC и антибиотиков на полимикробные биопленки.

СПРАВКА

Казанский (Приволжский) федеральный университет

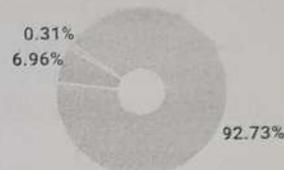
о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.СТРУКТУРА

Автор работы: Рыскулова Аян Баратовна
Самоцитирование рассчитано для: Рыскулова Аян Баратовна
Название работы: диплом рыскулова
Тип работы: Не указано
Подразделение:

РЕЗУЛЬТАТЫ

ЗАИМСТВОВАНИЯ	6.96%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	92.73%
ЦИТИРОВАНИЯ	0.31%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%



ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 25.05.2021

Модули поиска: ИПС Адилет; Библиография; Сводная коллекция ЭБС; Интернет Плюс; Сводная коллекция РГБ; Цитирование; Переводные заимствования (RuEn); Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu); Переводные заимствования по Интернету (EnRu); eLIBRARY.RU; СПС ГАРАНТ; Модуль поиска "КПФУ"; Медицина; Диссертации НББ; Перефразирования по eLIBRARY.RU; Перефразирования по Интернету; Патенты СССР, РФ, СНГ; Шаблонные фразы; Кольцо вузов; Переводные заимствования

Работу проверил: Бабынин Эдуард Викторович
ФИО проверяющего

Дата подписи:

Подпись проверяющего



Чтобы убедиться в подлинности справки, используйте QR-код, который содержит ссылку на отчет.

Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего. Предоставленная информация не подлежит использованию в коммерческих целях.